

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Suzana Petrošević, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA *Rhizoctonia* sp.

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Suzana Petrošević, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA *Rhizoctonia* sp.

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Suzana Petrošević, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA *Rhizoctonia* sp.

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Gljive.....	4
2.1.1. <i>Rhizoctonia</i>	5
2.2. Eterična ulja.....	10
2.2.1. Osnovne komponente eteričnih ulja.....	15
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	17
3.1. Postavljanje pokusa.....	18
3.2. Statistička obrada podataka.....	23
4. REZULTATI.....	24
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. POPIS LITERATURE.....	31
8. SAŽETAK.....	34
9. SUMMARY.....	35
10. POPIS SLIKA.....	36
11. POPIS TABLICA.....	37

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Zahvaljujući povećanoj upotrebi mineralnih gnojiva, zaštitnih sredstava, ali i novostvorenim kultivarima, kao i suvremenoj agrotehnici, prinosi uzgajanih kultura izrazito su se povećali. Na taj su način stvoreni preduvjeti za razvoj tzv. konvencionalne poljoprivrede. Butorac (1999.) definira konvencionalnu poljoprivredu kao poljoprivredu koja uključuje stvaranje visokorodnih kultivara i hibrida, suvremenu i intenzivnu agrotehniku, primjenu pesticida i mineralnih gnojiva. Kako su prinosi primjenom mineralnih gnojiva i ostalih agrokemikalija rasli, poljoprivrednici su promijenili mišljenje o agrokemikalijama i počeli su ih masovno koristiti budući da je njihova primjena osiguravala veću zaradu. Očito je taj pristup ostvario izvanredne rezultate za poljoprivrednike, ali već krajem šezdesetih godina prošloga stoljeća počinju se javljati negativne promjene u okolišu koje su bile povezane s prekomjernom upotrebom agrokemikalija (Kisić, 2014.).

Provedba ekološke poljoprivrede jedan je od načina kojim se mogu umanjiti negativne posljedice izazvane konvencionalnom poljoprivredom. Ekološka, biološka ili organska proizvodnja specifičan je koncept održivog upravljanja u poljoprivredi i šumarstvu koji uključuje uzgajanje životinja i biljaka, proizvodnju hrane, sirovina i prirodnih vlakana te obradu početnih proizvoda. Ekološka proizvodnja obuhvaća sve ekološki, gospodarski i društveno opravdane proizvodno-tehnološke tehnike, postupke i mehanizme, najprihvatljivije upotrebljavajući plodnost tla i dostupne vode, prirodna obilježja životinja, biljaka i krajobraza, povišenje prinosa i rezistentnosti biljaka uz pomoć prirodnih sila i zakona, uz reguliranu primjenu gnojiva, sredstava za biljnu i životinjsku zaštitu, shodno međunarodno prihvaćenim odredbama i pravilima.

Ovaj oblik proizvodnje je definiran i reguliran zakonom, uredbama, pravilnicima i standardima u većini država te cjelokupna proizvodnja mora u svim koracima biti u skladu s propisima (Beljo i sur., 2016.).

Ekološkom poljoprivredom omogućeno je održivo upravljanje prirodnim resursima (očuvanje plodnosti tla, vode i atmosfere, faune i flore), zabranjena je uporaba kemijskih pesticida, neprirodnih mineralnih gnojiva i drugih agrokemikalija. Također je omogućeno ponovno uspostavljanje prirodne ravnoteže čime se čuva biološka raznolikost, omogućen je razvitak malih obiteljskih gospodarstava, poticanje razvitka ruralnih područja. Ekološka poljoprivreda pridonosi razvitku eko sela i eko turizma te na takav način spaja zanatske, poljoprivredne i turističke djelatnosti.

Gljivice su najraširenija i najštetnija skupina patogena koja ugrožava rast i razvoj biljaka, a katkad uzrokuje i njihovu smrt.

Gljivični patogeni biljaka mogu uzrokovati visoke gubitke u prinosu i kvaliteti poljskog usjeva, voća i drugog jestivog biljnog materijala, a to postaje sve važnije pitanje za ljudsko zdravlje i globalnu ekonomiju u ovom stoljeću, s povećanjem ljudske populacije i prijetnjama klimatskih promjena za obradivu zemlju. Razumijevanje gljivične patogeneze omogućava nam da bolje razumijemo kako gljivični patogeni inficiraju biljke domaćine, ali također pruža vrijedne informacije za kontrolu biljnih bolesti, uključujući nove strategije za sprječavanje, odlaganje ili suzbijanje razvoja gljivica.

(<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/9724283/>)

Bolest se javlja i razvija kada su ispunjena tri uvjeta: prisustvo patogena, osjetljiva biljka i povoljni uvjeti sredine. Biljka na prisustvo patogena može reagirati vidljivim i specifičnim reakcijama koje se nazivaju simptomi bolesti. Kod biljaka koje odlikuje visoka osjetljivost simptomi se mogu manifestirati na cijeloj površini, dok druge prema uzročniku bolesti posjeduju visoku otpornost, pa simptomi izostaju. Najčešći simptomi bolesti biljaka uzrokovanih fitopatogenim gljivama su: smanjen rast, nekroze, kloroze, deformacije i smanjenje (hipoplazija, hiperplazija, hipertrofija) te uvenuće. Najdestruktivniji uzročnici uvenuća su gljive iz rodova *Fusarium*, *Verticillium* i *Rhizoctonia*

(<https://www.psss.rs/forum/6/32701-simptomi-biljnih-bolesti-uzrokovanih-fitopatogenim-gljivama.html>).

Rhizoctonia vrste su jedne od važnih patogena koji su prepreka za proizvodnju hrane. *Rhizoctonia* sp. su sveprisutne i varijabilne gljivice tla. Mnogi izolati *Rhizoctonia* uzrokuju svjetski važne bolesti na većini važnih svjetskih biljnih kultura, kao što su: žitarice, pamuk, krumpir, šećerna repa, povrće, ratarske kulture, travnjaci, ukrasne biljke, voćke i šumsko drveće.

Uzročnici bolesti biljaka u zemljama u razvoju smanjuju biljni prinos za oko 12 %. Pesticidi koji se danas koriste u velikoj mjeri zagađuju atmosferu, ostavljaju rezidue u tlu, vodi i biljnim proizvodima te time negativno utječu na zdravlje ljudi. Za kontrolu bolesti biljaka poželjno je primjenjivati prirodne proizvode velikog broja biljaka kako bi se izbjegao negativan utjecaj kemijskih sredstava.

I ljudi i biljke osjetljivi su na gljivične infekcije patogenim gljivama i poznato je da su neki sintetički fungicidi učinkoviti u njihovoj kontroli. Postoji sve veća zabrinutost javnosti zbog povećane opasnosti za zdravlje i okoliš povezane sa sintetičkim molekulama. Zbog toga se

aktivno proučavaju alternativne, sigurne i prirodne metode za razvoj novih antifungalnih sredstava. Prirodni proizvodi iz biljaka imaju veliki potencijal kao novi izvori fungicida za suzbijanje patogenih gljiva. Nedavno je došlo do velikog interesa za korištenje eteričnih ulja kao mogućih prirodnih nadomjestaka za konvencionalne sintetičke fungicide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748643/>).

Cilj ovog rada je bio utvrditi djelovanje 10 različitih eteričnih ulja na porast micelija *Rhizoctonia* sp.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gljive

Gljive (lat. Fungi, grč. Mikes) se ubrajaju u najbrojnije biotske uzročnike biljnih bolesti, a bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikoze. Otkriveno je oko 70 000 vrsta gljiva od kojih je oko 10 000 biljnih patogena.

Gljive koje parazitiraju biljke su mikroskopskih veličina, eukariotski organizmi, razmjerno jednostavne građe i heterotrofi, dakle bez klorofila (Jurković i sur. 2010.). Budući da nemaju klorofil ne mogu vršiti fotosintezu i hrane se gotovom organskom tvari.

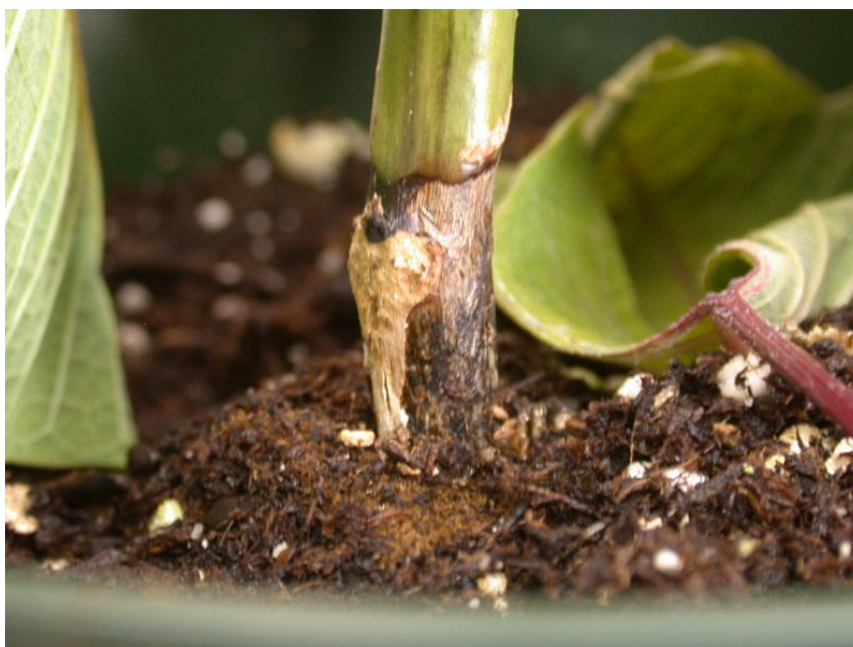
Fitopatogene gljive uzrokuju oko 75% bolesti biljaka te se ubrajaju u prevladavajuće uzročnike biljnih bolesti. Svrstane su u skupinu parazita jer žive na račun domaćina tj. uzimaju hranu od domaćina pri čemu mu nanose štetu. Razlikujemo fakultativne i obligatne parazite. Fakultativni mogu živjeti i samostalno, dok se u obligatne parazite ubrajaju vrste koje isključivo ovise o hranjivim tvarima domaćina i ne postoji niti jedan drugi način na koji se mogu opskrbiti hranom ili je proizvesti. Fitopatogene gljive koje su obligatni paraziti su uzročnici pepelnice i hrđe na biljkama. Fitopatogene gljive u biljku prodiru na tri načina: kroz prirodne otvore biljke, kroz mehaničke ozljede biljnog tkiva ili prodiru izravno kroz neozlijeđeno biljno tkivo. Rasprostranjivati se mogu putem oruđa za obradu tla, vektorskim organizmima, vjetrom i na mnoge druge načine. Svaka fitopatogena gljiva može napasti jednu ili više biljnih vrsta.

Gljive se razmnožavaju vegetativno (nespolno) dijeljenjem hifa i sporama, posebnim strukturama koje mogu nastati na dva načina (Jurković i sur. 2010.). Spore nespolnim putem mogu nastati transformacijom i fragmentacijom hifa i one omogućavaju širenje parazita tijekom vegetacije. Spolnim razmnožavanjem (izogamija ili heterogamija) spore nastaju nakon spajanja fiziološki različitih spolnih stanica (gamete) (Jurković i sur. 2010.). Spore nastale spolnim razmnožavanjem parazitu osiguravaju preživljavanje nepovoljnih uvjeta okoline ili kada nema povoljnog domaćina za zarazu nekom gljivom.

2.1.1. *Rhizoctonia*

Rhizoctonia je rod anamorfnih gljiva koji pripada redu *Cantharellales*. *Rhizoctonia* vrste ne proizvode spore nego su sastavljene od sklerocija i hifa, saprofitne su, ali i fakultativni biljni patogeni koji uzrokuju važne bolesti na većini važnih svjetskih biljnih kultura. Sklerocije im omogućavaju višegodišnji opstanak u zarezanom biljnom tkivu ili u tlu.

Rhizoctonia raste uduž gornje biljne površine, pa često napada stabljiku na liniji tla. Počinju stvarati smeđe do crvenkasto smeđe lezije koje se uvećavaju, a nalaze se u blizini tla (Slika 1.) te stabljika na kraju propada. Zaražene stabljike su suhe, shrvane i „žilavog“ izgleda. Ograničeno je kretanje vode i hranjivih tvari u biljci te dolazi do venuća, osobito tijekom vrućih dana (Slike 2. i 3).



Slika 1. Trulež stabljike

(Izvor: <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/rhizoctonia-root-rot-symptoms-and-how-to-control/>)



Slika 2. Venuće zbog ograničenog kretanja vode u biljci

(Izvor: <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/rhizoctonia-root-rot-symptoms-and-how-to-control/>)



Slika 3. Venuće zbog ograničenog kretanja hranjivih tvari u biljci

(Izvor: <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/rhizoctonia-root-rot-symptoms-and-how-to-control/>)

Rastu *Rhizoctonia* pogoduju visoke temperature te je stoga problematičnije kasno proljeće i ljeto. U svom životnom ciklusu ne zahtjeva slobodnu vodu, pa u mediju rasta preferira umjerenu vlagu.

Rhizoctonia vrste su stanovnici tla i uobičajeno je nalazimo u poljima, vrtovima itd. Široki raspon domaćina *Rhizoctonia* uzrokuje brojne bolesti. Najčešća i najpoznatija vrsta *Rhizoctonia* koja uzrokuje zaraze biljnih vrsta je *Rhizoctonia solani*. Prvotno ju je na krumpiru opisao Julius Kühn 1858. godine. Nalazi se u tlu i velika je raznolikost biljaka domaćina ovom patogenu (Tablica 1.). Kako svi nazivi bolesti koje uzrokuje *R. solani* nisu prevedeni od strane struke na hrvatski jezik u Tablici 1. su ostavljeni engleski nazivi.

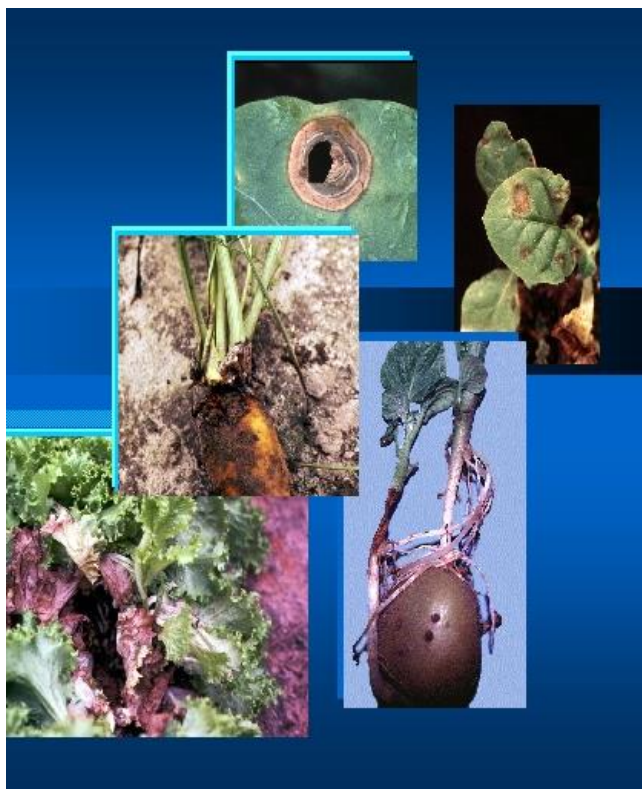
Tablica 1. Domaćini *Rhizoctonia solani* i *Rhizoctonia* bolesti

BOLESTI	DOMAĆINI
"sheath blight", "sheath spot"	riža
"sclerotinia disease", "leaf blight", "banded leaf"	kukuruz
"leaf blight", "banded leaf"	sirak
"leaf blight"	grah, soja, krumpir
"summer blight"	inkarnatka
"rot"	kupus
"bottom rot"	zelena salata
"damping off" and "crown root rot"	mrkva
"damping off"	soja, lan, šećerna repa
"bud rot"	jagoda
"root rot"	japanske rotkvice, podzemna djetelina
"false sheath blight"	riža
"sheath blight"	đumbir
"root rot" and "leaf blight"	šećerna repa
"large patch"	patlidžan
"black scurf" and "stem/stolon cankers"	rajčica
"damping off" and "root rots"	Soja, luk, grašak, zrno graha, pamuk, kikiriki

(Izvor: <https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>)

R. solani prije svega napada podzemne dijelove biljke kao što su korijen i sjeme, a također može zaraziti i nadzemne dijelove (stabljiku, lišće, plodove, mahune) (Slika 4.). Najčešći simptom *Rhizoctonia* karakterizira otežano klijanje teško zaraženih sjemenki, dok zaražene sadnice propadaju prije ili nakon izlaska iz tla. Zaražene sadnice koje gljiva ne ubije često imaju rak, crveno-smeđe lezije na stabljici i korijenu (Slika 5.), što je tipični simptom *Rhizoctonia* infekcije (Slika 6.). Osim podzemnih dijelova biljke, gljiva povremeno zarazi tkivo otpalih plodova i lišća u blizini ili na površini tla. Ovaj tip bolesti često se javlja jer su micelij i /ili sklerocija gljivice blizu biljke

(<https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>).



Slika 4. Simptomi *R. solani*

(Izvor: <https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>)



Slika 5. Karakteristične crvene lezije infekcija s *Rhizoctonia* sp. i trulež korijena (s desne strane) i zdravi korijenov sustav s lijeve strane

(Izvor: <https://soybeanresearchinfo.com/diseases/rhizoctonia.html>)



Slika 6. Mlade biljke zaražene s *Rhizoctonia solani*

(Izvor: <https://soybeanresearchinfo.com/diseases/rhizoctonia.html>)

Većina bolesti *Rhizoctonia* je uzrokovana micelijem i /ili sklerocijom, a nekoliko važnih bolesti šećerne repe, graha i duhana proizlaze iz infekcije bazidiosporama koje služe i kao izvor za brzo širenje gljivica na velike udaljenosti.

R. solani preživljava dugi niz godina stvaranjem sklerocija na biljnom tkivu ili u tlu. Određeni patotipovi *R. solani* s riže su stvorili sposobnost stvaranja sklerocija s debelim vanjskim slojem koji im omogućuje plutanje i opstanak u vodi. *R. solani* također preživljava kao micelij kolonizirajući organske tvari tla kao saprofit. Sklerocij i / ili micelij prisutan u tlu i / ili na biljnom tkivu klijaju da bi se stvorile vegetativne niti (hife) gljivice koje mogu napasti širok raspon usjeva

(<https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>).

Rhizoctonia može uzrokovati neravnomjeran rast usjeva i oštećenja korijena te mogu rezultirati gubicima uroda zrna pšenice od 8 – 19 %.

2.2. Eterična ulja

U sadašnje vrijeme se sve više traga za ekološki prihvatljivim alternativama u zaštiti bilja te se iste sve više primjenjuju. Potencijal korištenja eteričnih ulja u borbi protiv patogena opisuje Jobling (2000.).

Ona u sebi sadrže niz sastojaka koji mogu zaustaviti ili usporiti rast bakterija i drugih mikroorganizama (Bakkali i sur., 2008).

Prema definiciji iz Hrvatskoga općeg leksikona eterična ulja su hlapljive tvari jaka mirisa koje se nalaze u biljkama; smjesa su različitih organskih spojeva, većinom terpena; najviše se proizvode destilacijom biljnog materijala vodenom parom, a nose imena biljaka od kojih potiču (npr. ružino, lavandino, metvičino ulje); služe u prehrambenoj industriji, parfumeriji, medicini (Dimitrov, 2000.).

Eterična ulja se mogu nalaziti u različitim dijelovima biljke: u laticama (ruža), lišću (eukaliptus), korijenju trave (vetiver), kori (cimet), neživom dijelu srčike (sandal), citrusnoj kori (limun), sjemenkama (kim), u rizomima (valerijana), lukovici (češnjak), nadzemnim ili vršnim dijelovima biljke (mažuran) te u smoli, a možemo ih pronaći u više različitih dijelova biljke (Wildwood, 2002.).

Specijalizirana tkiva biljke sadrže uljne žlijezde te se u njima akumuliraju eterična ulja. Što je u biljci manje uljnih žlijezda, ulje je skuplje i obratno.

Iako su eterična ulja ponekad omalovažavana kao „otpadni nusproizvodi“ biljnog metabolizma, istraživanja su pokazala da ih biljke koriste za zaštitu od bolesti, odbijanje grabežljivaca te privlačenje kukaca za oprašivanje.

Osim što su topljiva u običnom biljnom ulju, eterična su ulja topljiva i u alkoholu, žumanjku i u voskovima (npr. otopljeni pčelinji vosak ili jojoba). Međutim, samo su djelomice topljiva u vodi i tek u ponešto većoj mjeri u octu (Wildwood, 2002.).

Gotovo sva eterična ulja su na sobnoj temperaturi (18-22 °C) lako hlapljive i lako pokretljive tekućine koje jako lome svjetlost, te intenzivno mirišu. Hlađenjem mnoga očvrstnu ili se iz njih izdvajaju čvrsti sastojci. Zbog te osobine hlađenje se koristi kao tehnološki proces za dobivanje mentola ili nekih drugih stearoptena iz eteričnih ulja (Dimitrov, 2000.).

Kakvoću i količinu biljnog eteričnog ulja određuju mnogi međusobno povezani faktori. Osim plodnosti i vrste tla, također su značajni klima i nadmorska visina. Stoga njemačka kamilica sadrži veću količinu ulja ukoliko raste na tlu bogatom kalcijem. Postoje i iznimne biljke čije je ulje mnogo kvalitetnije od ulja proizvedenog samo nekoliko kilometara dalje, gdje su tlo i klima naizgled jednaki. Nadalje, godišnje doba i doba dana znatno utječu na kakvoću i količinu prinosa eteričnog ulja, koje kola biljkom prema dnevnom i godišnjem rasporedu. Pritom svaka biljna vrsta ima karakterističan ritam (Wildwood, 2002.).

Eterična ulja je potrebno čuvati u tamnim, punim i dobro zatvorenim bočicama na hladnom i zamračenom mjestu. Temperatura ne smije prelaziti 15 °C. Zračni čep ili prodiranje zraka u bočicu dovodi do bržeg starenja i ugušćivanja ulja, te ona potamne i većinom postanu kisele reakcije (Dimitrov, 2000.).

Biljna eterična ulja i ekstrakti okarakterizirani su kao nefitotoksični spojevi i možebitno djelotvorni protiv brojnih mikroorganizama.

Mnogi znanstvenici su proučavali djelovanje eteričnih ulja i njihovih elemenata na razvoj micelija raznih gljiva koje mogu izazvati raznolike bolesti ljudi, biljaka i životinja.

Mnoga eterična ulja i njihovi elementi imaju snažno fungicidno i fungistatično djelovanje. Eterična ulja se proučavaju zbog dobrog biološkog djelovanja na različite uzročnike bolesti

ljudi, biljaka i životinja. Brojna eterična ulja izuzev antifungalnog djelovanja imaju snažno djelovanje protiv bakterija, insekata i nematoda.

Mnoga eterična ulja biljnog porijekla u *in vitro* i *in vivo* uvjetima pokazuju antifungalni učinak na široki spektar fitopatogenih gljiva.

Ustanovljeno je da brojna eterična ulja i njihovi elementi sprječavaju rast micelija mnogih fitopatogenih gljiva.

Poneka eterična ulja u *in vitro* uvjetima jače ili slabije djeluju protiv mnogih fitopatogenih gljiva koje uzrokuju razne bolesti biljaka, dok neka ulja stimulativno djeluju na porast micelija pojedinih fitopatogenih gljiva.

Biološki učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti gljive, kemijskom sastavu ulja koji je u vezi s biljnom vrstom iz koje je ulje dobiveno i njezinim zemljopisnim porijeklom, o primijenjenoj količini ulja te o načinu aplikacije (Ćosić i sur., 2014.).

Antifungalna aktivnost može se pripisati prisutnosti nekih komponenti poput karvakrola, linalola, cimena, timola, α -terpinil acetata, pinena za koje se već zna da pokazuju antimikrobnu aktivnost. Brojna znanstvena istraživanja istakla su važnost i doprinos mnogih biljnih obitelji, tj. *Liliaceae*, *Rutaceae*, *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Caesalpinaceae*, *Piperaceae*, *Sapotaceae* itd., koje se koriste kao ljekovite biljke. Objavljeno je nekoliko *in vitro* istraživanja koja potvrđuju učinak eteričnih ulja i njihovih glavnih spojeva na patogenim gljivicama biljaka i ljudi.

Ulje bergamota (*Citrus hystrix* DC.) pokazuje antagonističko djelovanje protiv sedam vrsta rižinih patogenih gljivica *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *Pyricularia arisea* i *Rhizoctonia solani*, koje imaju velik gospodarski utjecaj, i utvrđeno je da su i koncentracija i vrsta aktivne tvari važni čimbenici koji određuju njihovo potencijalno antifungalno djelovanje (Patker i sur. 1993.).

Na inaktivaciju *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani* eterična su ulja djelotvorna, dok su protiv *Aspergillus flavus* manje učinkovita.

Ukupno 39 esencijalnih ulja testirano je na antifungalna djelovanja kao isparljivi spojevi protiv pet fitopatogenih gljivica u dozi od 1 μ l po ploči. Pet esencijalnih ulja pokazalo je inhibitorno djelovanje protiv rasta micelija najmanje jedne fitopatogene gljivice. *Origanum*

vulgare eterično ulje inhibira rast micelija svih pet ispitivanih gljivica. I ulja cinkumina i eukaliptusa citriodora pokazuju *in vitro* antifungalno djelovanje protiv četiri fitopatogene gljive, osim *Colletotrichum gloeosporioides*. Eterično ulje *Thymus vulgris* suzbijalo je rast micelija *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani*, a *Cymbopogon citratus* bio je aktivan samo na *F. oxysporum*. Kemijski sastav pet aktivnih esencijalnih ulja *E. citriodora* i *C. cyminum* imaju potencijal protiv gljivičnih konzervanasa za suzbijanje bolesti skladištenja različitih kultura (Lee i sur., 2007.).

Eterično ulje i ekstrakti iz biljke noćni jasmin nepovoljno utječu na rast *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum* (Al- Reza i sur., 2010.).

Lee i sur., (2007.) su proveli *in vitro* istraživanje s pet uzročnika bolesti biljaka (*B. cinerea*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *Pythium ultimum*) i 39 eteričnih ulja. Od svih ispitivanih ulja utvrdili su da eterično ulje origana ima najjače antifungalno djelovanje pri čemu je inhibiralo porast micelija ovisno o vrsti za 55 do 93 %. Također dobar učinak su imala ulja kumina i eukaliptusa pri čemu se inhibicija rasta micelija kretala između 50 i 91 %, odnosno između 41 % do 83 %.

Singh i sur. (1992.) utvrdili su antifungalni utjecaj eteričnog ulja slatke naranče na velik broj uzročnika biljnih bolesti. Utvrdili su snažno fungistatično djelovanje na *H. oryzae*, *C. falcatum*, *F. vudum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, dok su za *A. niger*, *R. solani*, *C. gloeosporioides*, *A. flavus*, *P. debaryanum* ustanovili potpunu inhibiciju rasta micelija.

Lee i sur., (2007.) utvrdili su da ulje slatke naranče nije imalo inhibitorni učinak na razvoj gljiva *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *B. cinerea* i *P. ultimum*, što potvrđuje tezu o utjecaju velikog broja čimbenika na učinak eteričnih ulja.

Katooli i sur. (2011.) su istraživali inhibitorni utjecaj esencijalnih ulja eukaliptusa i timijana na šest patogenih gljivica: *Asperigilus flavus*, *Pencillium digitatum*, *Bipolaris sorokiniana*, *C. gloeosporioides*, *P. ultimum* i *Rhizoctonia solani*. *Rhizoctonia solani* i *Bipolaris sorokiniana* izolirani su iz riže, *A. flavus* i *P. digitatum* iz plijesni kruha, a *C. gloesporoideus* je izoliran iz citrusa. Eterično ulje eukaliptusa potpuno je inhibiralo porast micelija *Rhizoctonia solani* i *Pyhitium ultimum* u svim koncentracijama esencijalnih ulja nakon 30 dana. Eterično ulje timijana potpuno je inhibiralo porast micelija *Pencillium digitatum* u koncentraciji ulja od 75 i 100%, a kod *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pyhitium ultimum* i

Rhizoctonia solani u svim koncentracijama esencijalnih ulja nakon 30 dana. Razlike do dvanaestog dana pokusa nisu bile statistički značajne.

Prema Bittner i sur. (2009.) eterično ulje biljke *Laureliopsis phillipiana*, čije su glavne komponente 3-karen i cineol, smanjile su rast micelija *R. solani* za 51%.

Vodeni i alkoholni ekstrakti kima pokazali su također inhibitorni učinak na rast micelija gljive *R. solani* (AlKhail, 2005.).

Ulje timijana imalo je pozitivan inhibitorni učinak na rast micelija gljiva *R. solani* i *C. gloeosporioides*, dok ulja lavande (*L. spica*), metvice (*M. piperita*), bora (*P. sylvestris*), ružmarina (*R. officinalis*), kadulje (*S. lavendulaefolia*, *S. sclarea*) nisu imala nikakav inhibitorni učinak na rast micelija (Lee i sur., 2007.).

Pérez-Sánchez i sur. (2007.) ispitivali su utjecaj eteričnog ulja *Thymus zygis* na pet patogenih gljiva (*Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* Simmonds, *Fusarium oxysporum* i *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary) te su utvrdili dobar inhibitorni učinak na sve gljive, a komponente ulja koje se povezuju s najboljim učinkom su 3-oktanol i α -terpinen.

2.2.1. Osnovne komponente eteričnih ulja

Sva eterična ulja sadrže određene osnovne i sporedne komponente. Analiza eteričnih ulja vrši se pomoću plinske kromatografije (GC – gas chromatography) te kombinacije plinske kromatografije i masene spektrometrije (CG- mass spectrometry (MS)) (Iacobelis et al., 2005.).

Temeljne komponente ulja klinčićevca (*Eugenia caryophyllata*) su eugenol (76,8%), β -kariofilen (17,4%), α -humulen (2,1%) i eugenil acetat (1,2%).

Glavnu komponentu ulja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) također čini eugenol (82,3%) kao kod ulja klinčićevca.

Osnovne komponente eteričnog ulja običnog bora (*Pinus sylvestris*) su α -pinen (19,44 – 57,6%), β -pinen (2,8 – 17,09%), kamfen (0,44 – 16,84%) i bornil-acetat (1,4 – 7,3%).

Ulje metvice (*Mentha piperita*) čini mentol (37,4%), mentil acetat (17,4%) i menton (12,7%).

Osnovne komponente ulja lavande (*Lavandula angustifolia*) su linalol (16 - 28%), linalil acetat (26 – 47,5%), 1,8-cineol (5,1 – 15,5%), lavandulil acetat (1,3 – 4,3%) i α -terpineol (2,3 – 3,75%).

Temeljne komponente ulja timijana su timol (45-48%) i p -cimen (18,5 - 21,5%).

Osnovne komponente ulja anisa (*Pimpinella anisum*) čine anetol (76,9 – 93,7%) i γ -himahalen (0,4 – 8,2%).

Ulje gorke naranče (*Citrus aurantium ssp. amara*) se sastoji od limonena (78 – 94,1%), β -pinena (0,5 – 3,4%) i mircena (1,8%).

Glavne komponente ulja kadulje (*Salvia officinalis*) čine α -tujon (39 - 43%), β -tujon (5 - 9%), 1,8- cineol (7,5 - 25%) i kamfor (13 - 22,5%).

Osnovne komponente ulja kima (*Carum carvi*) čine karvon (38 - 72%), limonen (19 - 39%), α -pinen (5%) i germakren D (2,8%).

Mehanizam djelovanja eteričnih ulja i njihovih komponenti temelji se pretežno na njihovom utjecaju na staničnu membranu gljiva, odnosno uništavanju njezine strukture što dovodi do smrti stanice, blokiranju izgradnje stanične membrane te inhibiciji klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja (Harris, 2002.).

3. MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje je provedeno tijekom 2019. godine u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu. U postavljenom pokusu (*in vitro*) ispitivan je inhibicijski utjecaj različitih eteričnih ulja na porast micelija gljive *Rhizoctonia* sp. U pokusu je korišteno 10 eteričnih ulja (Slika 7.) i izolati gljive *Rhizoctonia* sa paprike i duhana.

Ispitivan je utjecaj eteričnih ulja lista cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), klinčićevca (*Eugenia caryophyllata*), bijelog bora (*Pinus sylvestris* L.), paprene metvice (*Mentha x piperita* L.), lavande prave (*Lavandula officinalis* Chaix), timijana timola (*Thymus vulgaris* L.), anisa (*Pimpinella anisum* L.), usplođa gorke naranče (*Citrus aurantium* L.), ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) i kima (*Carum carvi* L.).

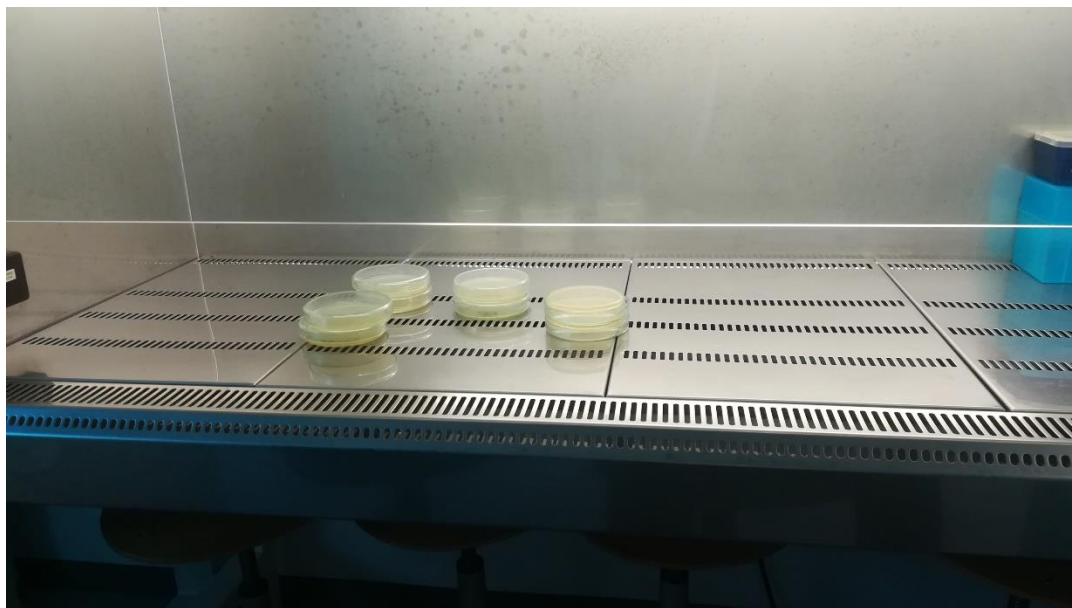


Slika 7. Eterična ulja korištena u pokusu
(foto: S. Petrošević, 2019.)

3.1. Postavljanje pokusa

Iz pohranjenih kultura s uzorcima, u laminaru (komora za rad u sterilnim uvjetima)

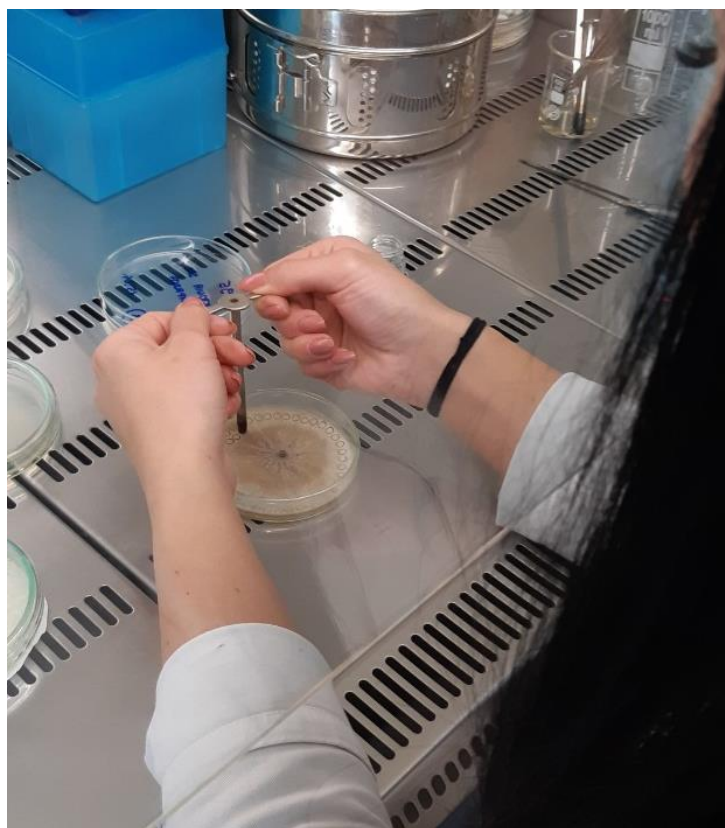
(Slika 8.) je precijepljen svaki uzorak četiri puta na hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama u kojima se nalazi antibiotik. Nakon precijepljivanja Petrijeve zdjelice se drže u termostatskoj komori na tjedan dana.



Slika 8. Laminar (komora za rad u sterilnim uvjetima)

(foto: S. Petrošević, 2019.)

Nakon tjedan dana u laminaru bušačem su izrezani diskovi micelija (Slika 9.) i sterilnom iglom precijepljeni na nove hranjive podloge sa antibiotikom.



Slika 9. Rezanje diskova micelija bušačem

(foto: S. Petrošević, 2019.)

PDA (potato dextrose agar) (Slika 10.) je gotova smjesa za hranjivu podlogu, a kako bi dobili krutu podlogu dodaje se tehnički agar (agar technical) (Slika 11.) i zatim destilirana voda. Koristili smo 21 g potato dextrose agar, 1,40 g agar technical i 0,5 l destilirane vode. Smjesa se u tikvicama kuhala u vodenoj kupelji pri čemu se prah topio u trajanju od 1h uz povremeno miješanje.

Nakon sat vremena, tikvice s hranjivom podlogom smo pokrili s improviziranim čepom te omotali u novine i stavili u autoklav (uređaj za sterilizaciju vrućom vodenom parom) (Slika 12.), na temperaturu od 120 °C u trajanju od 20 minuta. Nakon što se temperatura spusti na 96 °C hranjivu podlogu vadimo iz autoklava i dodajemo antibiotik streptomycin zbog sprječavanja razvoja bakterija. Tikvice se zatvore i protresu te sadržaj pod laminarom izlijevamo u Petrijeve zdjelice koje smo prethodno također sterilizirali.



Slika 10. Potato dextrose agar i agar technical
(foto: S. Petrošević, 2019.)

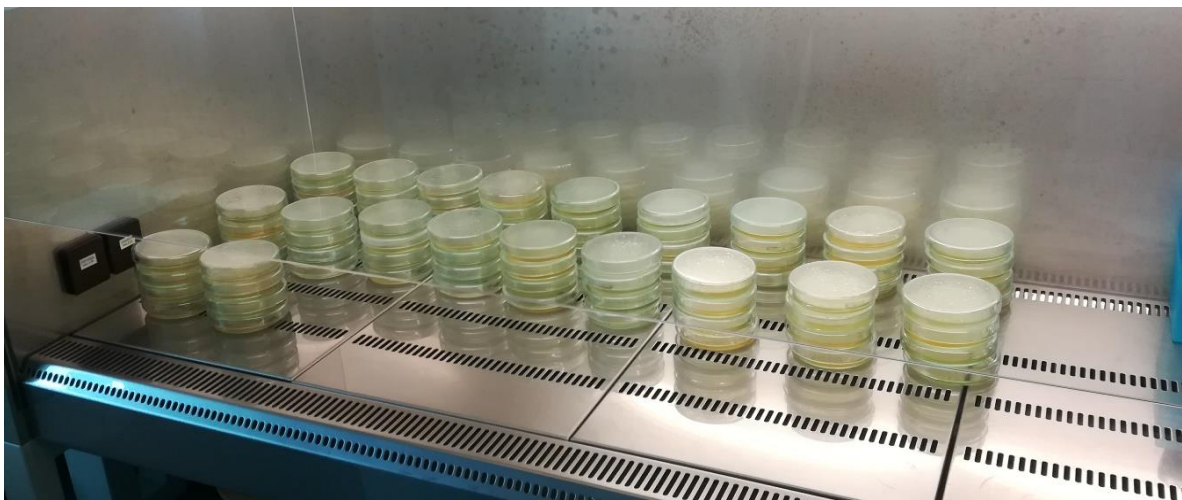


Slika 11. Tikvice s hranjivom podlogom omotane u novine u autoklavu
(foto: S. Petrošević, 2019.)



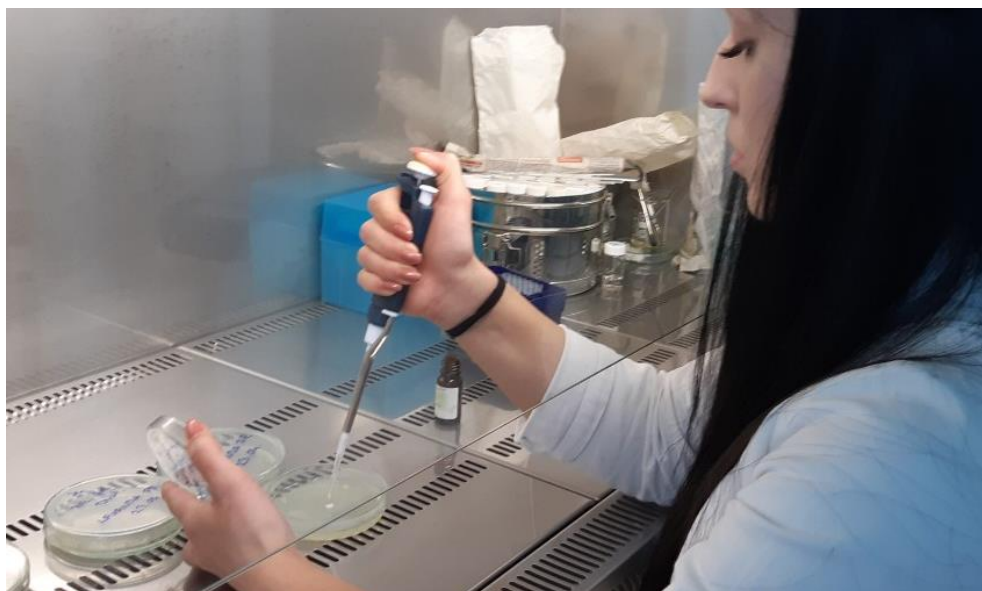
Slika 12. Autoklav
(foto: S. Petrošević, 2019.)

Na slici br.13 su prikazane gotove hranjive podloge u laminaru.



Slika 13. Gotove hranjive podloge
(foto: S. Petrošević, 2019.)

Nakon što se PDA podloga ohladila, u svaku Petrijevu zdjelicu, na četiri mjesta udaljena 5 mm od ruba zdjelice, sterilnom iglom precijepe se diskovi micelija ispitivanih gljiva. U sredinu svake Petrijeve zdjelice postavi se kružni isječak filter papira promjera 5 mm koji je prethodno steriliziran u autoklavu. Pomoću mikropipete na svaki disk aplicira se 5 μ l eteričnog ulja (Slika 14.), odnosno destilirana voda u kontrolnoj varijanti.



Slika 14. Aplikacija eteričnog ulja na filter papir

Nakon naciepljivanja gljiva Petrijeve zdjelice se inkubiraju u termostatu komori (Slika 15.) na temperaturi od 22 °C tijekom 9 dana pri svjetlosnom režimu 12 sati sjetlost/12 sati tama. Pokus je postavljen u 4 ponavljanja, a zone inhibicije su se mjerile 3., 6. i 9. dan od naciepljivanja.



Slika 15. Inkubirane Petrijeve zdjelice u termostatu komori

(foto: S. Petrošević, 2019.)

3.2. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci statistički su obrađeni analizom varijance (Vukadinović, 1985.).

4. REZULTATI

Trećeg dana od inokulacije za izolat *Rhizoctonia* sp. s paprike najveći porast micelija utvrđen je u kontrolnoj varijanti (zona inhibicije 0,00 mm) (Tablica 2.)(Slika 16.) te zatim u pokusnoj varijanti s eteričnim uljem bijelog bora (zona inhibicije 6,69 mm), dok je u svim ostalim pokusnim varijantama s eteričnim uljima zona inhibicije bila iznad 16 mm.

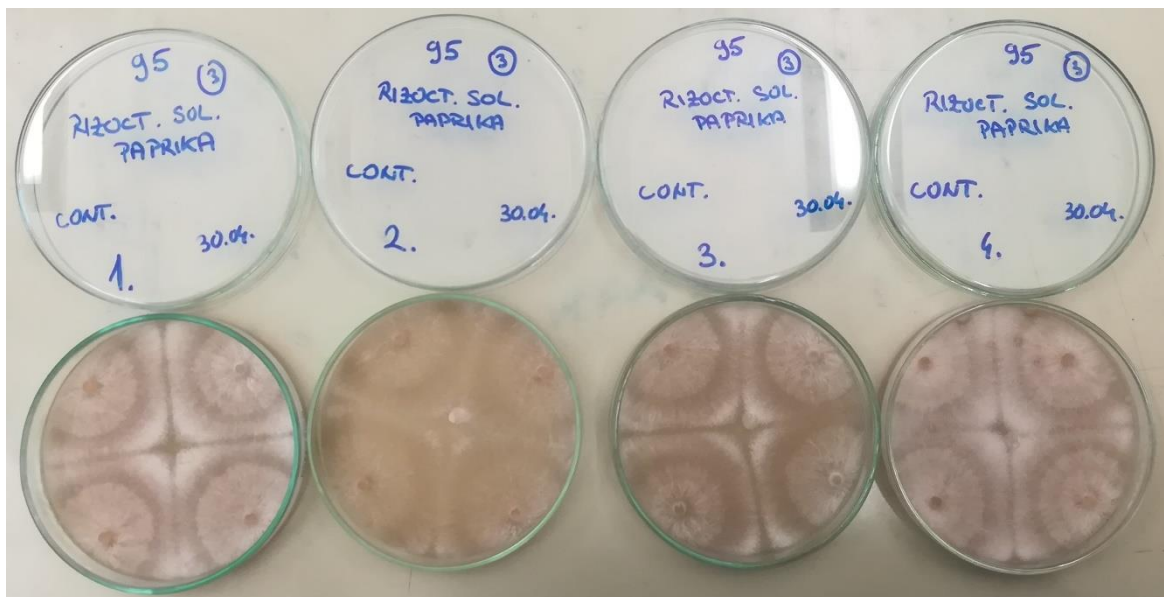
Tablica 2. Zona inhibicije mm (izolat s paprike)

Eterična ulja	3. dan	6. dan	9. dan
Cimet list	18,75	10,75	7,06
Klinčićevec	16,88	9,31	5,63
Bijeli bor	6,69	0,47	0,00
Paprena metvica	28,50	17,19	9,75
Lavanda prava	20,75	9,25	0,00
Timijan timol	29,31	27,13	24,75
Anis	29,50	19,94	7,50
Gorka naranča	20,69	0,63	0,00
Ljekovita kadulja	18,38	0,69	0,00
Kim	17,88	3,81	0,00
Kontrola	0,00	0,00	0,00
LSD 0,05	7,08	10,05	9,88
LSD 0,01	9,30	13,21	12,98

Šestog dana od inokulacije statistički vrlo značajno veća zona inhibicije utvrđena je u pokusnoj varijanti s uljem timijana (zona inhibicije 27,13 mm) u odnosu na kontrolnu varijantu (zona inhibicije 0,00 mm) i pokusne varijante s uljima gorke naranče (zona inhibicije 0,63 mm), ljekovite kadulje (zona inhibicije 0,69 mm), kima (zona inhibicije 3,81 mm) i bijelog bora (zona inhibicije 0,47 mm). Statistički značajnih razlika u veličini zone inhibicije nema između kontrolne varijante i svih preostalih varijanti s uljima.

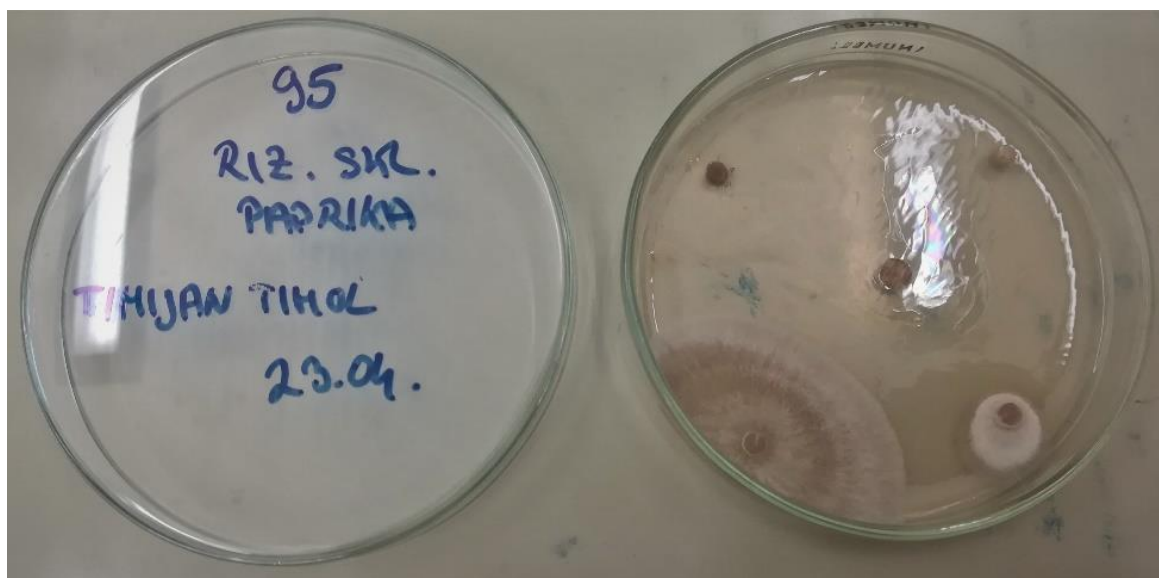
Kod zadnjeg mjerenja deveti dan od inokulacije statistički vrlo značajno veća zona inhibicije utvrđena je u pokusnoj varijanti s uljem timijana u odnosu na kontrolnu varijantu te sva preostala ulja. Između kontrolne i pokusnih varijanti sa svim preostalim uljima, statistički

značajnih razlika u zoni inhibicije nije bilo. Najjači fungistatski učinak imalo je ulje timijana budući da je zona inhibicije (24,75 mm) te je kod kod primjene tog ulja bila statistički vrlo značajno veća razlika u odnosu na veličinu zone inhibicije u odnosu na ostale pokusne varijante (Slika 17.).



Slika 16. Zona inhibicije u kontrolnoj varijanti

(foto: S. Petrošević, 2019.)



Slika 17. Zona inhibicije ulja timijana

(foto: S. Petrošević, 2019.)

Treći dan od inokulacije za izolat s duhana statistički vrlo značajno veća zona inhibicije u odnosu na kontrolu utvrđena je u svim pokusnim varijantama s uljima (Tablica 3.). Statistički značajnih razlika u veličini zone inhibicije između pokusnih varijanti s uljima nije bilo.

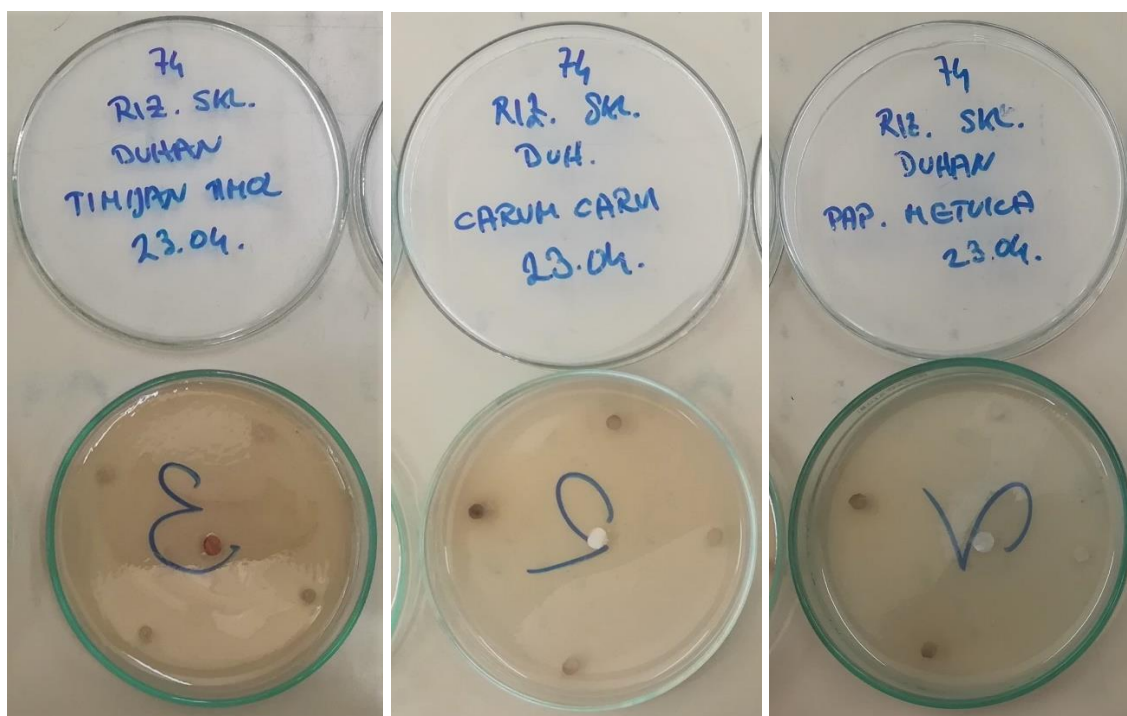
Tablica 3. Zona inhibicije mm (izolat s duhana)

Eterična ulja	3. dan	6. dan	9. dan
Cimet list	26,50	21,19	15,19
Klinčićevec	25,25	22,25	17,31
Bijeli bor	24,81	16,31	6,44
Paprena metvica	29,00	29,00	29,00
Lavanda prava	27,44	21,94	16,94
Timijan timol	29,56	29,56	29,56
Anis	29,38	25,88	22,56
Gorka naranča	29,69	21,25	9,13
Ljekovita kadulja	28,06	19,56	11,06
Kim	29,25	29,25	29,25
Kontrola	0,00	0,00	0,00
LSD 0,05	3,85	7,96	11,27
LSD 0,01	5,06	10,46	14,81

Šesti dan od inokulacije statistički vrlo značajna razlika utvrđena je kod timijana (zona inhibicije 29,56 mm), kima (zona inhibicije 29,25 mm) i paprene metvice (zona inhibicije 29,00 mm) u odnosu na bijeli bor (zona inhibicije 16,31 mm). Statistički vrlo značajno veća zona inhibicije u odnosu na kontrolnu varijantu utvrđena je u svim varijantama pokusa s uljima.

Kod zadnjeg mjerenja, deveti dan od inokulacije, statistički vrlo značajno veća zona inhibicije u odnosu na kontrolnu varijantu utvrđena je kod svih pokusnih varijanti s uljima. U varijantama s uljima timijana (zona inhibicije 29,56 mm), kima (zona inhibicije 29,25 mm) i paprene metvice (zona inhibicije 29,00 mm) utvrđene su statistički vrlo značajne veće zone inhibicije u odnosu na pokuse s uljima bijelog bora (zona inhibicije 6,44 mm), gorke naranče (zona inhibicije 9,13 mm) i ljekovite kadulje (zona inhibicije 11,06 mm).

U sva tri mjerenja veličine zone inhibicije kod ulja timijana, kima i paprene metvice ostale su nepromijenjene (Slika 18.).



Slika 18. Zone inhibicije kod ulja timijana, kima i paprene metvice
(foto: S. Petrošević, 2019.)

5. RASPRAVA

Na izolatu s paprike u kontrolnoj varijanti i pokusnoj varijanti s uljem bijelog bora utvrđeno je da je porast micelija gljive statistički vrlo značajno bolji u odnosu na ostale pokusne varijante, te možemo reći da je ulje bijelog bora djelovalo stimulativno na porast gljive.

Pri prvom mjerenju (tri dana nakon inokulacije), ulja cimeta, klinčićevca, metvice, lavande, timijana, anisa, gorke naranče, kadulje i kima statistički su vrlo značajno utjecala na smanjenje rasta micelija gljive.

Pri posljednjem mjerenju (devet dana nakon inokulacije), ulja cimeta, klinčićevca, metvice, timijana i anisa i dalje su imala negativan utjecaj na rast micelija gljive, dok ulja bijelog bora, lavande, gorke naranče, kadulje i kima nisu imala antifungalno djelovanje na rast micelija gljive.

Jedno (timijan) od deset eteričnih ulja je pokazalo značajno antifungalno djelovanje na porast micelija u odnosu na kontrolnu varijantu te je statistički vrlo značajno negativno djelovalo na razvoj micelija.

Mnogi autori su ustanovili snažno antifungalno djelovanje eteričnog ulja timijana.

Na izolatu s duhana su pri prvom mjerenju (tri dana nakon inokulacije) sva ulja statistički vrlo značajno utjecala na smanjenje rasta micelija.

Pri posljednjem mjerenju (devet dana nakon inokulacije) najslabije inhibitorno djelovanje pokazala su ulja bijelog bora, gorke naranče i kadulje, dok su ulja metvice, timijana i kima potpuno inhibirala rast micelija.

Eterična ulja bijelog bora, lavande, gorke naranče, kadulje i kima imala su stimulirajući učinak na porast micelija izolata s paprike, dok su na izolat s duhana imala inhibirajući učinak.

Ulje timijana je kod oba izolata imalo statistički vrlo značajan negativni učinak na porast micelija. Ulja metvice i kima su na izolatu s duhana potpuno inhibirala rast micelija, dok na izolatu s paprike nisu imala antifungalno djelovanje.

Na izolatu s duhana sva eterična ulja su djelomično ili potpuno inhibirala rast micelija navedenog patogena.

Većina istraživanja koja proučavaju antifungalno djelovanje eteričnih ulja, kao i naše, provedena su u *in vitro* uvjetima. Daljnja istraživanja svakako bi trebalo provoditi u *in vivo* uvjetima budući da rezultati s istim uljima, biljnim vrstama i patogenima mogu biti vrlo različita.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog laboratorijskog istraživanja o antifungalnom djelovanju eteričnih ulja na porast dva različita izolata *Rhizoctonia* sp. može se zaključiti:

Različita eterična ulja imaju različit utjecaj na porast istog izolata *Rhizoctonia* sp.

Isto eterično ulje može imati različit utjecaj na porast dva različita izolata *Rhizoctonia* sp.

S obzirom na rezultate ovog istraživanja ulje timijana je pokazalo najbolji antifungalni učinak, odnosno imalo je najveću zonu inhibicije te ga iz tog razloga možemo smatrati potencijalnim alternativnim oblikom koji bi se mogao primjeniti u zaštiti bilja.

7. POPIS LITERATURE

1. AlKhail, A.A.A. (2005.): Antifungal Activity of Some Extracts Against Some Plant Pathogenic Fungi, Pak. J. Biol. Sci., 8.
2. Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y. , Kang, S. C. (2010.). Inhibition of Plant Pathogens In Vitro and In Vivo wiht Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pestic. Biochem. Physiol., 96.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008.): Biological effects of essential oils. Rev. Food Chem. Toxicol.
4. Beljo, J., Barbarić, M., Čagalj, M., Duranović, A., Filipović, A., Ivanković, M., Kohnić, A., Mandić, A., Leko, M., Prlić, M., Rajić, M., Ostojić, I., Trkulja, V., (2016.): Ekološka proizvodnja smilja i eteričnog ulja – dosadašnje spoznaje. Algoritam.
5. Bittner, M., Aguilera, M.A., Hernández, V., Arbert, V., Becerra, J., Casanueva, M.E. (2009.): Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (CHILEAN MONIMIACEAE), Chilean Journal of Agricultural Research, 69.
6. Butorac, A. (1999.): Opća agronomija. Školska knjiga.
7. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U knjizi Sharma N. i sur. „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management—, 273292. Wiley Blackwell, UK.
8. Dimitrov, I. (2000.): Aroma i fitoterapija: Liječenje biljem i eteričnim uljima. Sirač.
9. Grgić, S. (2016.): "Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *Botrytis cinerea*." Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:453599>
10. Harris, R. (2002.): Progress with superficial mycoses using essential oils, International Journal of Aromatherapy, 12.
11. Iacobelis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F., Senatore, F. (2005.): Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils, J. Agric. Food Chem., 53(1).
12. Jobling, J. (2000): Essential oils: A new idea for post harvest disease control. Good Fruits and Vegetables Magazine 11.
13. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K., (2010.): Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.
14. Katooli, N., Maghsodlo, R., Razavi, S.E. (2011.): Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi, Journal of Plant Breeding and Crop Science, 3.

15. Kell, K. (2016.): "Utjecaj eteričnih ulja na gljivu *Monilia fructigena*." Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:010973>
16. Kisić, I. (2014.): Uvod u ekološku poljoprivredu. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
17. Klobučar, D. (2015.): "Rast gljive *Botrytis cinerea* u prisustvu eteričnih ulja." Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:062777>
18. Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007.): Antifungal Activity of Five Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi, Plant Pathol. J. <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200721138102939.page>
19. Patker, K.L., Usha, C.M., Shetty, S.H., Paster, N., Lacey, J., (1993.): Effect of spice oils on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. Lett Appl Microbiology 17.
20. Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C., Uebera, J.L. (2007.): Fungitoxic Activity Against Phytopathogenic Fungi and the Chemical Composition of *Thymus zygis* Essential Oils, Food Science and Technology International, 13.
21. Ravlić, M. (2011.): "Utjecaj eteričnih ulja na porast važnijih fitopatogenih gljiva". Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, https://bib.irb.hr/datoteka/592392.Diplomski_rad_Ravli_Mpdf
22. Singh G., Upadhyay R. K., Narayanan C. S., Padamkumari K. P., Rao G. P. (1992.): Fungitoxic activity of volatile oils of *Hyptis suaveolens*. Fitoterapia, 63.
23. Stazić, L. (2017.): "Fitopatogene gljive." Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:117401>
24. Špoljarić, M. (2017.): "Utjecaj eteričnih ulja na razvoj fitopatogenih gljiva." Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 2017. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:103396>
25. Wildwood, C. (2002.): Aromaterapija: Enciklopedija eteričnih ulja, njihovih pripravaka i primjene. Zagreb.

26. <https://www.psss.rs/forum/6/32701-simptomi-biljnih-bolesti-uzrokovanih-fitopatogenim-gljivama.html>
27. https://books.google.hr/books?id=vebsCAAAQBAJ&pg=PR15&lpg=PR15&dq=Rhizoctonia+spp+are+ubiquitous+and+variable+soil+fungi.&source=bl&ots=wri_Qt6Vq3&sig=ACfU3U1dqC_7hOtGi2cbpFcO8mkTbpgyLw&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwi8npvD_fLjAhUWxMQBHZZ1B-4Q6AEwBHoECAkQAQ#v=onepage&q=Rhizoctonia%20spp%20are%20ubiquitous%20and%20variable%20soil%20fungi.&f=false
28. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407010115>
29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748643/>
30. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38675748/ANTIFUNGAL_INVESTIGATIONS_ON_PLANT_ESSENTIAL_OILS._A_REVIEW.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DANTIFUNGAL_INVESTIGATIONS_ON_PLANT_ESSEN.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190808%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190808T231801Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=14ca8c8fc81f615784e979293a819e03786bb2f7d04468679f59c654c71d9e1d
31. <https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>
32. <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/rhizoctonia-root-rot-symptoms-and-how-to-control/>

8. SAŽETAK

Cilj ovog rada je bio utvrditi djelovanje 10 različitih eteričnih ulja (list cimeta, klinčićevec, bijeli bor, paprena metvica, lavanda, timijan, anis, usplođe gorke naranče, ljekovita kadulja i kim) na porast micelija *Rhizoctonia* sp. izolata s paprike i duhana. Pokus je proveden u *in vitro* uvjetima na PDA podlozi. Postavljen je u 4 ponavljanja, a zone inhibicije su se mjerile 3., 6. i 9. dan od naciepljivanja. Eterična ulja bijelog bora, lavande, gorke naranče, kadulje i kima imala su stimulirajući učinak na porast micelija izolata s paprike, dok su na izolat s duhana imala inhibirajući učinak. Ulje timijana je kod oba izolata imalo statistički vrlo značajan negativni učinak na porast micelija. Ulja metvice i kima su na izolatu s duhana potpuno inhibirala rast micelija, dok na izolatu s paprike nisu imala antifungalno djelovanje.

Ključne riječi: eterična ulja, *Rhizoctonia* sp., inhibicija, antifungalno djelovanje

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of 10 different essential oils (cinnamon leaf, cloves, white pine, peppermint, lavender, thyme, anise, bitter orange, medicinal sage and caraway) on the growth of mycelium *Rhizoctonia* sp. isolates from peppers and tobacco. The experiment was performed *in vitro* on a PDA medium. It was set in 4 repetitions, and the zones of inhibition were measured on days 3, 6, and 9 after inoculation. White pine, lavender, bitter orange, sage and caraway essential oils had a stimulating effect on the mycelium growth of pepper isolates, while they had a inhibitory effect on tobacco isolates. Thyme oil had a statistically significant negative effect on mycelial growth in both isolates. Peppermint and cumin oils completely inhibited mycelium growth on tobacco isolate, while they did not have antifungal activity on pepper isolate.

Keywords: essential oils, *Rhizoctonia* sp., inhibition, antifungal activity

10. POPIS SLIKA

Slika 1. Trulež stabljike.....	5
Slika 2. Venuće zbog ograničenog kretanja vode u biljci.....	6
Slika 3. Venuće zbog ograničenog kretanja hranjivih tvari u biljci.....	6
Slika 4. Simptomi <i>R. solani</i>	8
Slika 5. Karakteristične crvene lezije infekcija s <i>Rhizoctonia</i> sp. i trulež korijena (s desne strane) i zdravi korijenov sustav s lijeve strane	9
Slika 6. Mlade biljke zaražene s <i>Rhizoctonia solani</i>	9
Slika 7. Eterična ulja korištena u pokusu.....	17
Slika 8. Laminar (komora za rad u sterilnim uvjetima).....	18
Slika 9. Rezanje diskova micelija bušačem.....	19
Slika 10. Potato dextrose agar i agar technical.....	20
Slika 11. Tikvice s hranjivom podlogom omotane u novine u autoklavu.....	20
Slika 12. Autoklav.....	21
Slika 13. Gotove hranjive podloge.....	22
Slika 14. Aplikacija eteričnog ulja na filter papir.....	22
Slika 15. Inkubirane Petrijeve zdjelice u termostatskoj komori.....	23
Slika 16. Zona inhibicije u kontrolnoj varijanti.....	25
Slika 17. Zona inhibicije ulja timijana.....	25
Slika 18. Zone inhibicije kod ulja timijana, kima i paprene metvice.....	27

11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Domaćini <i>Rhizoctonia solani</i> i <i>Rhizoctonia</i> bolesti.....	7
Tablica 2. Zona inhibicije mm (izolat s paprike).....	24
Tablica 3. Zona inhibicije mm (izolat s duhana).....	26

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na *Rhizoctonia* sp.

Suzana Petrošević

Sažetak

Cilj ovog rada je bio utvrditi djelovanje 10 različitih eteričnih ulja (list cimeta, klinčićevac, bijeli bor, paprena metvica, lavanda, timijan, anis, usplode gorke naranče, ljekovita kadulja i kim) na porast micelija *Rhizoctonia* sp. izolata s paprike i duhana. Pokus je proveden u *in vitro* uvjetima na PDA podlozi. Postavljen je u 4 ponavljanja, a zone inhibicije su se mjerile 3., 6. i 9. dan od nacjepljivanja. Eterična ulja bijelog bora, lavande, gorke naranče, kadulje i kima imala su stimulirajući učinak na porast micelija izolata s paprike, dok su na izolat s duhana imala inhibirajući učinak. Ulje timijana je kod oba izolata imalo statistički vrlo značajan negativni učinak na porast micelija. Ulja metvice i kima su na izolatu s duhana potpuno inhibirala rast micelija, dok na izolatu s paprike nisu imala antifungalno djelovanje.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Broj stranica: 37

Broj grafikona i slika: 18

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 33

Broj priloga:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: eterična ulja, *Rhizoctonia* sp., inhibicija, antifungalno djelovanje

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Agrobiotechnical Sciences in Osijek
University Graduate Study Organic Agriculture**

Graduate Thesis Faculty of

Antifungal activity of essential oils on *Rhizoctonia* sp.

Suzana Petrošević

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of 10 different essential oils (cinnamon leaf, cloves, white pine, peppermint, lavender, thyme, anise, bitter orange, medicinal sage and caraway) on the growth of mycelium *Rhizoctonia* sp. isolates from peppers and tobacco. The experiment was performed *in vitro* on a PDA medium. It was set in 4 repetitions, and the zones of inhibition were measured on days 3, 6, and 9 after inoculation. White pine, lavender, bitter orange, sage and caraway essential oils had a stimulating effect on the mycelium growth of pepper isolates, while they had a inhibitory effect on tobacco isolates. Thyme oil had a statistically significant negative effect on mycelial growth in both isolates. Peppermint and cumin oils completely inhibited mycelium growth on tobacco isolate, while they did not have antifungal activity on pepper isolate.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: Prof. Karolina Vrandečić

Number of pages: 37

Number of figures: 18

Number of tables: 3

Number of references: 33

Number of appendices:

Original in: Croatian

Key words: essential oils, *Rhizoctonia* sp., inhibition, antifungal activity

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Prof. Jasenka Ćosić, Full Profesor - president
2. Prof. Karolina Vrandečić, Full Professor - mentor
3. Prof. Jelena Ilić, Associate Professor- member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1